

# DETECTION METHOD OF ASSIMILABLE BACTERIUM, AND METHOD FOR MEASURING LATENT DEGRADATION ACTIVITY ON SPECIFIC SUBSTRATE OF SAMPLE BY USING THE DETECTION METHOD

Publication number: JP2000079000

Publication date: 2000-03-21

Inventor: SHIGENO TOSHIYA; SOMEYA TAKASHI

Applicant: SHOWA SHELL SEKIYU

Classification:

- international: C12Q1/06; C12Q1/64; C12Q1/06; C12Q1/64; (IPC1-7):  
C12Q1/06; C12Q1/64

- european:

Application number: JP19990093581 19990331

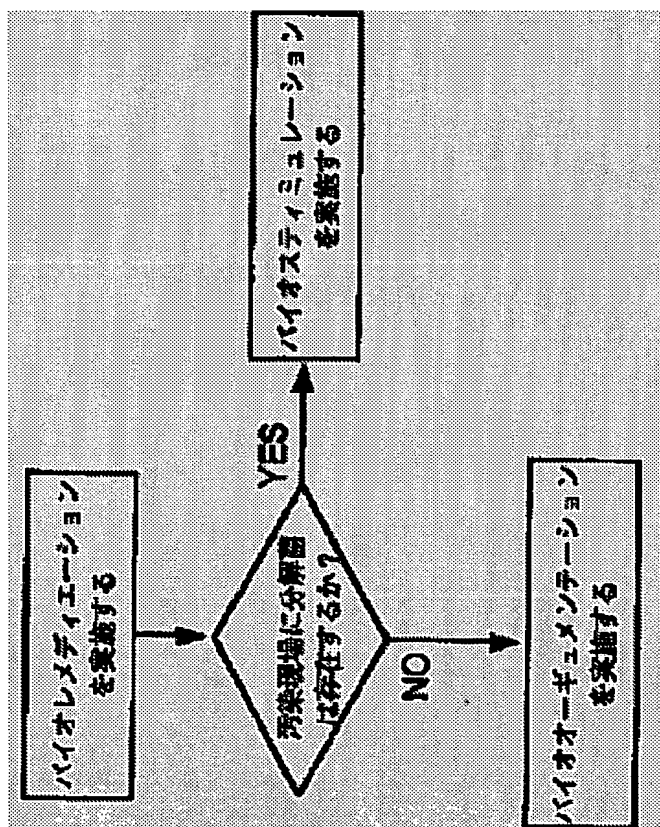
Priority number(s): JP19990093581 19990331; JP19980198023 19980629

Report a data error here

## Abstract of JP2000079000

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting assimilable bacteria capable of promptly deciding whether bio-stimulation is performed or whether bio-augmentation is performed, on the assumption of bio-mediation of an oil-polluted soil.

**SOLUTION:** This method for specifically detecting the assimilable bacteria of a specific substance, present in a solid sample comprises detecting the assimilable bacteria by using direct variable counts(DVC). A latent decomposition activity (S) on the specific substrate in the sample after (t) hours is detected by using the method and the equations  $X=X_0e^{\mu t}$  and  $S=YX=YX_0e^{\mu t}$  (S is the decomposition activity; X is an amount of microbial cells;  $X_0$  is an amount of initial microbial cells; Y is a yield of the microbial cells;  $\mu$  is a specific growth rate; t is a time).



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-79000

(P2000-79000A)

(43) 公開日 平成12年3月21日 (2000.3.21)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/06  
1/64

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/06  
1/64

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平11-93581

(22) 出願日 平成11年3月31日 (1999.3.31)

(31) 優先権主張番号 特願平10-198023

(32) 優先日 平成10年6月29日 (1998.6.29)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000186913

昭和シェル石油株式会社

東京都港区台場二丁目3番2号

(72) 発明者 茂野 俊也

東京都港区台場2丁目3番2号 昭和シェル石油株式会社内

(72) 発明者 染谷 孝

佐賀県小城郡小城町977番地1

(74) 代理人 100094466

弁理士 友松 英爾 (外1名)

(54) 【発明の名称】 資化性菌の検出方法および該検出方法を使用してサンプルの特定の基質に対する潜在的な分解活性を計測する方法

(57) 【要約】 (修正有)

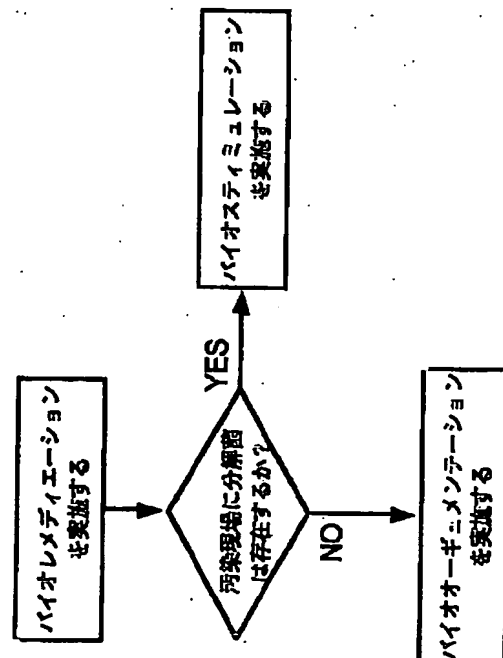
【課題】 石油汚染土壌のバイオレメディエーションを前提として、バイオスティミュレーションを行うのか、バイオオーギグメンテーションを行うのかを迅速に決定することが可能なことを特徴とする資化性菌の検出方法の提供。

【解決手段】 固体サンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法において、DVC法を用いることを特徴とする資化性菌の検出方法、および該方法と下式(1)と(2)を利用して、t時間後のサンプル中の特定の基質に対する潜在的な分解活性(S)を検出する方法。

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

$$S = YX = YX_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

(式中、S: 分解活性、X: 菌体量、 $X_0$ : 初期菌体量、Y: 菌体収率、 $\mu$ : 比増殖速度、t: 時間)



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法において、DVC法を用いることを特徴とする資化性菌の検出方法。

【請求項2】 DVC法とEB染色法を組み合わせる用いる請求項1記載の資化性菌の検出方法。

【請求項3】 培養前にサンプル中に含まれる有機物を除去する請求項1または2記載の資化性菌の検出方法。

【請求項4】 有機物を除去する手段が遠心洗浄である請求項3記載の資化性菌の検出方法。

【請求項5】 培養後に微生物の代謝産物の除去を行う請求項1～4のいずれかに記載の資化性菌の検出方法。

【請求項6】 代謝産物の除去が遠心洗浄である請求項5に記載の資化性菌の検出方法。

【請求項7】 サンプルが土壌または活性汚泥である請求項1～6のいずれかに記載の資化性菌の検出方法。

【請求項8】 特定物質が石油製品または化学物質である請求項1～7のいずれかに記載の資化性菌の検出方法。

【請求項9】 請求項1～8のいずれかに記載の資化性菌の検出方法及と下式(1)と(2)を利用して、t時間後のサンプル中の特定の基質に対する潜在的な分解活性(S)を検出する方法。

## 【数1】

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

(式中、X：菌体量、 $X_0$ ：初期菌体量、 $\mu$ ：比増殖速度、t：時間)

## 【数2】

$$S = YX = YX_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

(式中、S：分解活性、X：菌体量、 $X_0$ ：初期菌体量、Y：菌体収率、 $\mu$ ：比増殖速度、t：時間)

【請求項10】 サンプルが土壌または活性汚泥である請求項9記載の分解活性(S)を検出する方法。

【請求項11】 特定物質が石油製品または化学物質である請求項9～10の分解活性(S)を検出する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サンプル中、例えば土壌のような固体サンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法、および該検出する方法により得た検出結果に基づいて該サンプルの有する潜在的な分解活性を予測する方法に関する。

## 【0002】

【従来技術】(バイオレメディエーション)汚染土壌等のバイオレメディエーションや活性汚泥法による排水処理に於いては、栄養塩類の添加により既に存在している微生物を活性化する方法(バイオステイミュレーション法)と汚染物質の分解力の強い有用微生物を導入する方法(バイオオーギュメンテーション法)の2つがある。汚染土壌等の中に汚染物質の分解菌が既に多数存在して

いる場合には、バイオステイミュレーション法が有効である。しかし、分解菌が殆んど存在していない場合には、栄養塩類等を添加しても効果は期待できない。そこで、分解菌がほとんど存在していない場合には、バイオオーギュメンテーション法を行う必要がある。このように分解菌の有無は、バイオレメディエーションを行う際の手段を選択するための重要な情報であり、この情報によって採用する方法が決定される(図1参照)。

【0003】直接活性計測法(Direct Variable Counts、以下DVC法とも言う)DVC法は、東海大学海洋研究所の木暮らによって海洋微生物の計測法とした開発された手法である。細胞分裂阻害剤(ナリジクス酸、ピロミド酸、ピベミド酸等)の存在下で微生物を培養すると、生長はするが細胞分裂ができないため、菌体が通常の10～100倍程度に肥大する。この肥大した微生物は顕微鏡視野で容易に計測することが可能であり、DVC法は、この肥大した微生物を計測する方法である(図2、3参照)。

【0004】DVC法も微生物の増殖を利用する点では一種の培養法であるが、20～30時間の短時間の培養で済むこと、コロニー形成能のない微生物でも検出できること等、従来の培養法に比べ利点が多い。しかし木暮らのDVC法は海洋微生物への適応を念頭に開発された方法である為、土壌微生物に応用することができなかった。

【0005】佐賀大学の染谷らはDVC法が土壌微生物に応用できない理由は、土壌中にある夾雑物質による細胞分裂阻害剤の吸着にあると考えた。そこで彼らは細胞分裂阻害剤の添加量を増加させ、DVC法の土壌微生物への応用を図った。

【0006】また海洋微生物を対象としたDVC法では、微生物を観察する際に核酸の染色剤であるアクリジンオレンジを用いて蛍光観察を行っている。アクリジンオレンジ染色法は全菌数(Total Direct Counts、以下、TDC法とも言う。)を求める方法として一般的であるが、生育しない微生物や死細胞をも染色してしまい、また計測には熟練を要し、またこのアクリジンオレンジ染色法を土壌微生物に適応すると土壌粒子等も染色されてしまい良好な結果は得られない、と言う問題点がある。

【0007】染谷らは、土壌微生物の染色(蛍光染色)方法を検討し、遺伝子工学で多用されている代表的な核酸染色剤であるエチジウムブロミド染色法(以下、EB染色法とも言う。)が適していることを見出し、DVC法とEB染色法を組み合わせることにより土壌中の微生物の高効率な計測を可能とすることを見出した。

【0008】資化性菌の検出には選択培地を用いた培養法が一般的な方法である。これには平板培地上に生じる資化性菌の集落(コロニー)の数を計測したり、液体培地中で増殖する分解菌を濁度として測定する方法があ

る。しかし平板培地上でコロニーを形成しない微生物の検出ができず、検出できる微生物の種類が限定され、また、培養に数日かかる等の問題点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第一は、サンプル中、例えば土壌のような固体サンプル中存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法において、広範囲の多種類の資化性菌の特定およびその量を迅速に、かつ簡単に検出できることを特徴とする資化性菌の検出方法、特に、石油汚染土壌のバイオレメディエーションを前提として、汚染土壌中の石油分解菌の検出、さらには該菌の数を迅速に、かつ簡単に検出でき、前記バイオレメディエーションにおいて、バイオスティミュレーションを行うのか、バイオオーギギュメンテーションを行うのかを迅速に決定することが可能な方法を提供することにある。

【0010】本発明の第二は、前記第一の検出方法を利用してサンプルの有する特定基質に対する潜在的な分解活性を容易に推測することが可能な方法に関する。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明の特徴の第1は、固体サンプル中に存在する特定物質の分解菌を特異的に検出する方法において、DVC法を用いて分解菌、特に資化性菌を検出することにある。本発明においては、前記DVC法によって得られた肥大微生物を容易に、かつ観察あるいは計測できるように、該肥大微生物のみを鮮明に観察することができる染色方法、例えばEB染色法を組み合わせて用いるのが好ましい。なお、本発明において、分解菌、特に資化性菌を検出すると、菌の能力（例えば石油を分解する能力）の特定および該菌の総数を検出することを行う。

【0012】前記本発明の分解菌の検出方法は、サンプル、特に汚染土壌中に存在する石油製品を特異的に分解し、それを自身の細胞とすることのできる微生物である石油資化性菌および化学物質を特異的に分解し、それを自身の細胞とすることのできる微生物である化学物質資化性菌の検出、さらにはその菌の数を定量的に計測する方法に有効である。

【0013】また、本発明の分解菌の検出方法は、基本的には前記のような資化基質と計測対象の物質が一致する分解菌の計測あるいは検出に主に使用されるが、資化基質と計測対象の物質が一致しない分解菌であっても、資化基質と計測対象の物質の関係が明らかな分解菌の場合、例えば資化基質はメタンであるが、トリクロロエチレンの分解能を有するメタン資化性菌あるいは資化基質はフェノールであるが、トリクロロエチレンの分解能を有するフェノール資化性菌のような場合にも使用することが出来る。

【0014】石油分解菌の中にも、石油をエネルギー源等として生育する石油資化性菌（多くの分解菌がこのタ

イプであると考えられている）の他に、種類は多くないと考えられているが、石油は分解するが石油をエネルギー源として生育を行わない真の分解菌が存在する。本発明に於いては石油資化性菌を主な対象としているが、前記のような真の分解菌であっても、特異的な基質を明らかにすることにより、該菌の計測あるいは検出も行なうことができる。

【0015】本発明の分解菌の検出方法は、前記公知の資化性菌の検出方法と異なり、平板培地上でコロニーを形成しない資化性菌の検出も可能であるので、多種類の資化性菌の検出を行なうことができる。

【0016】本発明で採用することのできるサンプルとしては、DVC法によって資化性菌の検出することができるものであれば、特にその種類は制限されるものでなく、また、サンプルの種類も固体サンプルでも液体サンプルでも良く、例えば、土壌、活性汚泥、石油製品あるいは化学物質汚染土壌等が例示される。

【0017】本発明において、サンプルとして多くの有機物が含まれているサンプル（例えば土壌中には多くの有機物が含まれており、これら有機物は土壌中の微生物のエネルギー源となっている）をそのままDVC法に供すると、基質として加えた物質の資化性がなくとも、元来土壌中にある有機物を資化して肥大する微生物がバックグラウンドとして計測されてしまう、と言う問題が生ずることがある。

【0018】そこで、本発明者らは、前記バックグラウンドを最小限にするための手段について、さらに鋭意検討した結果、サンプルとして土壌培養前に中の前記有機物を除去することにより、前記バックグラウンドを最小限にすることが出来た。

【0019】さらに、本発明者らは、培養後に微生物の代謝産物の除去を行なうことにより、肥大微生物のみを鮮明に観察することができることを見出し、例えば培養後に代謝産物を洗浄、特に遠心洗浄を行なうことにより除去して、検出しようとする微生物の検出を簡単に、かつその数の検出も正確に行なうことができた。

【0020】本発明で採用するDVC法で使用する細胞分裂阻害剤としては、例えば、ナリジクス酸、ピロミド酸、ビベミド酸、シプロフロキサシン等が使用できる。

【0021】石油汚染土壌の生物的浄化（バイオレメディエーション）を行う際に、栄養剤のみを添加すればよいのか、あるいは微生物も導入する必要があるのかを判断するための有効な方法である。土壌浄化プロジェクトのビジネス化において重要な発明であるまた、本発明は固体サンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法において、前記石油汚染土壌の生物的浄化（バイオレメディエーション）を行う際に、栄養剤のみを添加すればよいのか、あるいは微生物も導入する必要があるのかを判断するための有効な方法である。土壌浄化プロジェクトのビジネス化において重要な発明であ

る

【0022】本発明の第二の特徴は、前記第一のサンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法を利用して、任意の土壌の特定基質に対する潜在的な分解活性を容易に推測できる方法をさらに提供したことにある。すなわち、本発明者は、前記第1の方法を利用すると初期菌体量 $X_0$ 、初期菌体1個の体積 $V_0$ および $t$ 時間後の菌体1個の体積 $V$ 、特に初期菌体量 $X_0$ を極めて正確に、かつ容易に検出できることに着目し、本発明に到達することができた。前記潜在的な分解活性とは、例えばある土壌に石油をこぼした時に自然浄化がどのくらいの速度で進行するかを示す指数であり、下式に示す分解量 $(S)$ に相当する。以下、前記の潜在的な分解活性を容易に推測できる方法を石油資化性菌を例にとり説明するが、前述のように本方法は石油資化性菌の場合に限定されるものではない。

【0023】石油資化性菌は石油成分を摂取して菌体を生産する(生育する)が、一定時間 $(t)$ 後の菌体量 $(X)$ は、図11に示すように次式(1)で表される。

【数3】

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

(式中、 $X_0$ ：初期菌体量、 $\mu$ ：比増殖速度、 $t$ ：時間)

前記初期菌体量 $(X_0)$ は、前記本発明の第一の方法によって求めることが必要である。前記 $\mu$ (比増殖速度)は、以下のようにして求めることができる。前式 $X = X_0 e^{\mu t}$ は $\ln X = \ln X_0 + \mu t$ と表されるので、例えば初期菌体量を1とすると、 $X_0 = 1$ 、すなわち、 $\ln X_0 = 0$ であるから、 $\ln X = \mu t$ となる。

【0024】前記 $X$ は以下のようにして求めることができる。前記 $X$ は $X = V/V_0$ と表され、前記第一の方法により初期の菌体1個の体積 $V_0$ および $t$ 時間後の菌体1個の体積 $V$ を計測することにより求める。前記 $\mu$ は以下のようにして求めることができる。前記のようにして得られた $X$ 、 $X_0$ および $t$ を式 $X = X_0 e^{\mu t}$ に代入することにより求めることができる。前記菌体収率 $Y$ は以下のようにして求めることができる。サンプル中の特定物質に対する分解活性を検出し、該分解活性を利用して求めることができる。例えば特定物質が石油である場合に石油は好氣的に分解されるので、その基質は酸素と石油であるので、特定量の石油を分解に要する酸素消費量を検出し、この酸素消費量と酸素消費量と初期菌体量 $X_0$ とが相関関係があることを利用して勾配係数として求めることができる。

【0025】一方、菌体収率 $Y$ が一定であるとする、分解量 $(S)$ は菌体量 $X$ に比例し、菌体量 $X$ は $X = X_0 e^{\mu t}$ にあるので、この関係は次式(2)で表すことが可能である。

【数4】

$$S = YX = YX_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

(式中、 $S$ ：分解活性、 $X$ ：菌体量、 $X_0$ ：初期菌体量、 $Y$ ：菌体収率、 $\mu$ ：比増殖速度、 $t$ ：時間)

前式(2)において、初期段階、すなわち $t \rightarrow 0$ においては、 $\mu t \rightarrow 0$ となり、 $e^{\mu t} \rightarrow 1$ に近似するので、 $S = YX_0$ と表すことができる。

【0026】前記のようにして検出あるいは算出した初期菌体量 $X_0$ 、初期菌体1個の体積 $V_0$ 、 $t$ 時間後の菌体1個の体積 $V$ 、菌体量 $X$ 、比増殖速度 $\mu$ および菌体収率 $Y$ と前式(1)および(2)を利用してサンプル中の特定の基質に対する潜在的な分解活性 $(S)$ を求めることが出来る。

【0027】前記第二の発明は、バイオレメディエーションを行う際に、栄養塩類の添加により既に存在している微生物を活性化する方法(バイオステイミュレーション法)で良いのか、あるいは分解対象の特定基質の分解力を有する微生物をさらに導入する方法(バイオオーギュメンテーション法)を採用する必要があるかの判断を行うための手段として、非常に有効である。

【0028】

【実施例】以下、本発明の資化性菌の検出方法を実施例により、さらに具体的に説明する。

【0029】実施例1

以下に本発明の実施例で採用する培養および染色法の具体的操作方法を示す。培養および染色は図4に示す以下のような操作工程の順序に従って実施した。

(a) 分散処理

佐賀大学内の畑より採取した土壌サンプルに滅菌超純水を加えて、攪拌処理を行ない100倍希釈土壌懸濁液とした。

(b) 遠心洗浄

前記(a)希釈土壌懸濁液1000 $\mu$ lを除菌水で3回、遠心洗浄(1200rpm、10分)した。

(c) DVC培地の添加

前記(b)の遠心洗浄で洗浄した希釈土壌懸濁液に下表1の組成のDVC培地を添加した。

【0030】

【表1】

DVC培地の組成	
成分	最終濃度( $\mu$ g/ml)
酵母エキス	250
ナリジクス酸	100
ピベミド酸	50
ピロミド酸	50

(d) インキュベート

前記(c)のDVC培地を添加した希釈土壌懸濁液を1.5ml容のポリプロピレン製試験管に入れ、600rpmの回転振とう器で24時間の培養を行った。

(e) 遠心洗浄

前記(d)の代謝産物を遠心洗浄した(1200rpm、10分)。

## (f) EB染色と蛍光観察

前記(e)の遠心洗浄後、培養物をエチジウムブロミド( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )で3分間染色した後、蛍光顕微鏡(B励起、対物100倍油浸系)で観察した。

## 【0031】実施例2

## (1) 土壌サンプル

石油汚染土壌は、昭和シェル石油(株)中央研究所の構内の林土壌約9kgに軽油を1%添加して作成した。この土壌はステンレス製のバケツに入れ、ビニール袋で密閉して25℃で約1ヶ月間の馴養を行った。通気は1週間に一度、土壌を攪拌混合することにより行った。

## (2) 前記土壌サンプルから石油資化性菌の検出

前記土壌サンプルから実施例1に示した方法により、石油資化性菌の検出を行ない、その結果を図8に示した。図8に於いては、サンプルをEBとCFDA(エステラーゼの基質、CFDAで染色される細胞はエステラーゼ活性がある)で二重染色しているため、石油資化性菌は黄緑色に光っている。培養を行う前のサンプルでも黄緑色に光る $1\mu\text{m}$ 以下の微生物が観察されている。培養24時間後のサンプルでは数 $\mu\text{m}$ に肥大して真緑色に光る微生物(図中に矢印で示したもの)が観察されている。前記のように石油資化性菌は肥大しても長くならず、球型に近い形或いは等しく変形した細胞として観察された。酵母エキスをを用いた場合には、肥大細胞は長く伸長した細胞として観察された。これに対して石油資化性菌の場合、肥大細胞は長くならず球形或いは著しく変形した細胞として観察された。これは石油が微生物の細胞膜に影響を与えているためと考えられる。

## 【0032】比較例1

前記実施例2において、培養前に遠心洗浄を行わない以外は同様に実施した。図5の(a)は培養を行う前の土壌の蛍光顕微鏡写真である。該図5の(a)では、小さく黄色に光る微生物(いずれも $1\mu\text{m}$ 以下の大きさ)が観察されるが、土壌粒子も暗く光っている為、微生物か否かの判断は難しい。また、培養した後の蛍光顕微鏡写真を図5の(b)として示す。図5の(b)では、土壌中の有機物をエネルギー源として数 $\mu\text{m}$ に肥大した微生物(バックグラウンド)が観察される。さらに、図5の(c)は遠心洗浄を行わない土壌に酵母エキスを添加して培養した後の蛍光顕微鏡写真である。数 $\mu\text{m}$ に肥大した多くの微生物が観察される。図5の(c)で観察された肥大細胞数から図5の(b)で観察された肥大細胞数を差し引いた肥大細胞数が新たに添加した酵母エキスを資化した微生物の菌数に相当すると考えられる。

【0033】これに対して、図6は培養前に遠心洗浄を行った実施例1の効果を示したものである。図6に示すいずれの値も、遠心洗浄を行っていない土壌のTDC( $1.1 \times 10^9$  細胞/g乾燥土壌)を100とした相対値である。TDCは遠心洗浄を行ってもほとんど変化しなかった。酵母エキスを添加しないで培養した系で

は、非洗浄で約25%あった菌数(バックグラウンド)が遠心洗浄することでほぼ0%に抑えられた。酵母エキスを添加した系の菌数は非洗浄で約70%、遠心洗浄で約50%であり、その差約20%は酵母エキス無添加時の非洗浄の菌数(バックグラウンド)にほぼ相当した。

## 【0034】比較例2

前記実施例2において、培養後に遠心洗浄を行わない以外は実施例2と同様に実施した。培養後の遠心洗浄を行わない本例のサンプルでは土壌粒子や微生物の代謝産物等もEBで染色されてしまい、肥大微生物を観察することが困難であった[図7の(a)]。これに対し、培養後に遠心洗浄を行う実施例2では、肥大微生物のみを鮮明に観察することができた[図7の(b)]。

## 【0035】実施例3

石油で汚染された土壌中の微生物相(フローラ)の変化石油汚染による土壌中のフローラの変化について検討を行った。石油で汚染された土壌としては、また、石油に汚染されていない土壌として、佐賀大学内の畑土壌を用いた。結果は図9に示した。値はいずれも軽油を添加する前のTDCを100とした相対値で示してある。軽油を200ppm、2000ppmになるように添加すると24時間でTDCはいずれも約40%減少した。DVC法で検出される石油資化性菌の数は5~12%であった。前記の現象は、石油汚染が土壌中のフローラに大きな影響を与えることを示す結果である。

【0036】軽油で馴養した土壌を用いて土壌中のフローラの変化を検討した。図10には、人工汚染土壌に於けるTDCとDVC法により検出された石油資化性菌数の変化を示した。TDCと石油資化性菌数はいずれも培養時間が経つにつれ減少した。特にTDCに対する石油資化性菌数の割合の減少は著しく、当初TDCの約60%であった石油資化性菌数は5ヶ月後には20%まで減少した。これは石油資化性菌のエネルギー源である軽油が分解・資化されて少なくなったためと考えられる。また総菌数が石油資化性菌数よりも緩やかに減少したのは、石油資化性菌が軽油を分解した代謝物や石油資化性菌の死菌等をエネルギー源として利用する微生物が増加したためと考えられる。本発明の資化性菌の計測方法により、前記土壌中の微生物相(フローラ)の変化の状態を計測することが出来る。

## 【0037】実施例4

本実施例に使用した石油汚染土壌は、厚木市周辺の数カ所より採取した土壌50gに軽油を1mlづつ添加して調整した。このサンプル土壌を培養容器(大倉電気製のクーロメーター)に入れ、培養をスタートさせた。培養は30℃で2~3日行い、その間の石油資化性菌の生育に伴う酸素吸収量を連続的に測定した。この酸素吸収量と前記実施例1に示す方法で石油資化性菌数を求め、この石油資化性菌数と酸素吸収量の関係は図12に示す結果が得られた。図12の勾配係数より菌体収率Yを求

め、これら結果と前式(1)および(2)を利用して潜在的な分解活性(S)を推定することができた。

【0038】

【効果】本発明は、固体サンプル中に存在する特定物質の資化性菌を特異的に検出する方法において、広範囲の多種類の資化性菌を迅速に、かつ簡単に検出できることを特徴とする資化性菌の検出方法、および前記検出方法により検出した前記資化性菌の総数とサンプルの有する前記特定基質に対する分解活性との相関関係より、該サンプルの特定の基質に対する潜在的な分解活性を容易に推定する方法が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】バイオレメディエーションの概略を説明した図である。

【図2】DVC法の原理を説明した図である。

(a) 核酸合成阻害剤を使用しない通常の培養の場合。

(b) 核酸合成阻害剤を使用するDVC法の場合。

【図3】DVC法におけるインキュベート前後の土壌細菌の形態変化を示す。

(a) インキュベート前の状態を示す。

(b) 24時間インキュベートした後の状態を示す。

【図4】実施例1で採用した培養および染色工程を示す図である。

【図5】非洗浄DVC法におけるDVCのバックグラウンドを示す図である。

(a) 培養を行なう前の土壌の状態を示す。

(b) 遠心洗浄を行なわなかった土壌を培養した後の土

壌の状態を示す。

(c) 遠心洗浄を行なわない土壌に酵母エキス(YE)を添加して培養した後の土壌の状態を示す。

【図6】洗浄DVC法の効果を示す図である。

【図7】DVC法の蛍光画像に及ぼす遠心洗浄の効果を示す図である。

(a) 洗浄を行なう前の土壌の状態を示す。

(b) 洗浄後の土壌の状態を示す。

【図8】軽油をエネルギー源として、DVCにより石油資化性菌の検出を行ない、その効果を示す図である。

(a) 培養を行なう前の土壌の状態を示す。

(b) 24時間培養を行なった後の土壌の状態を示す。

【図9】石油非汚染土壌(佐賀大学内の畑土壌)における石油添加DVC法でのTDCの減少を示す図である。

【図10】ポット内石油汚染土壌(室温静置)中のTDCとDVCの経時的変動を示す図である。

【図11】 $X = X_0 e^{\mu t}$ において、 $\mu$ を一定として $X_0$ を0.01、0.1、0.5、1.0としてシュミレーションを行った実施結果を示す図である。

【図12】実施例4の石油資化性菌数と酸素吸収量の関係を示す図である。

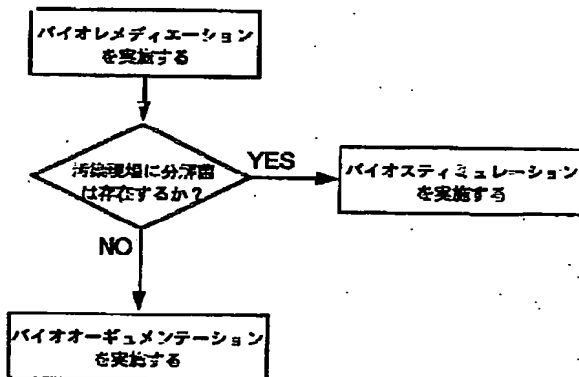
【符号の説明】

A 伸長・肥大した細胞(増殖能を持つ細胞)

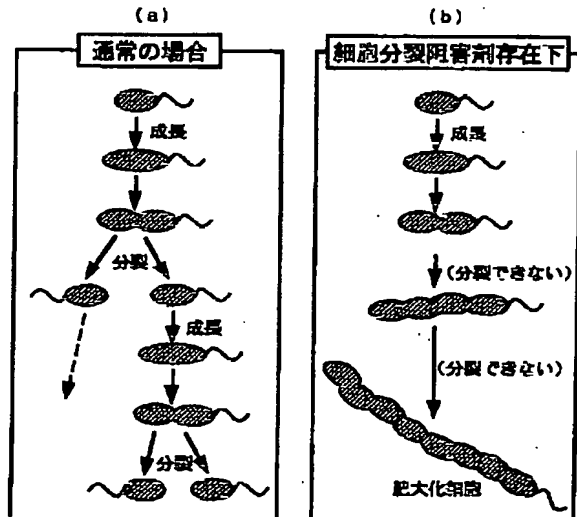
B 伸長・肥大せず小さいままの細胞(増殖能を持たない細胞)

← 伸長・肥大した細胞(増殖能を持つ細胞)を指すものである。

【図1】



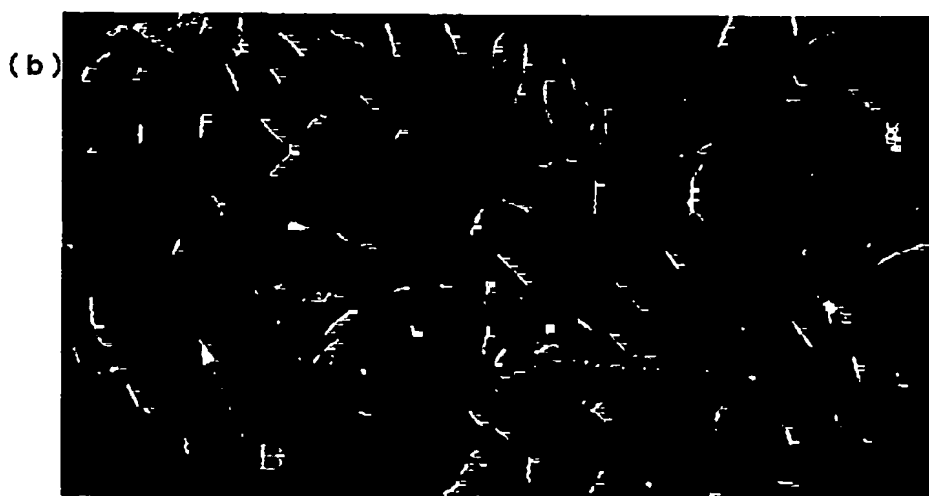
【図2】



【図3】

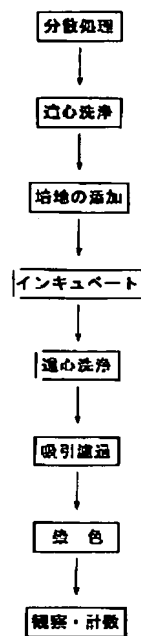


0 hr



24 hr

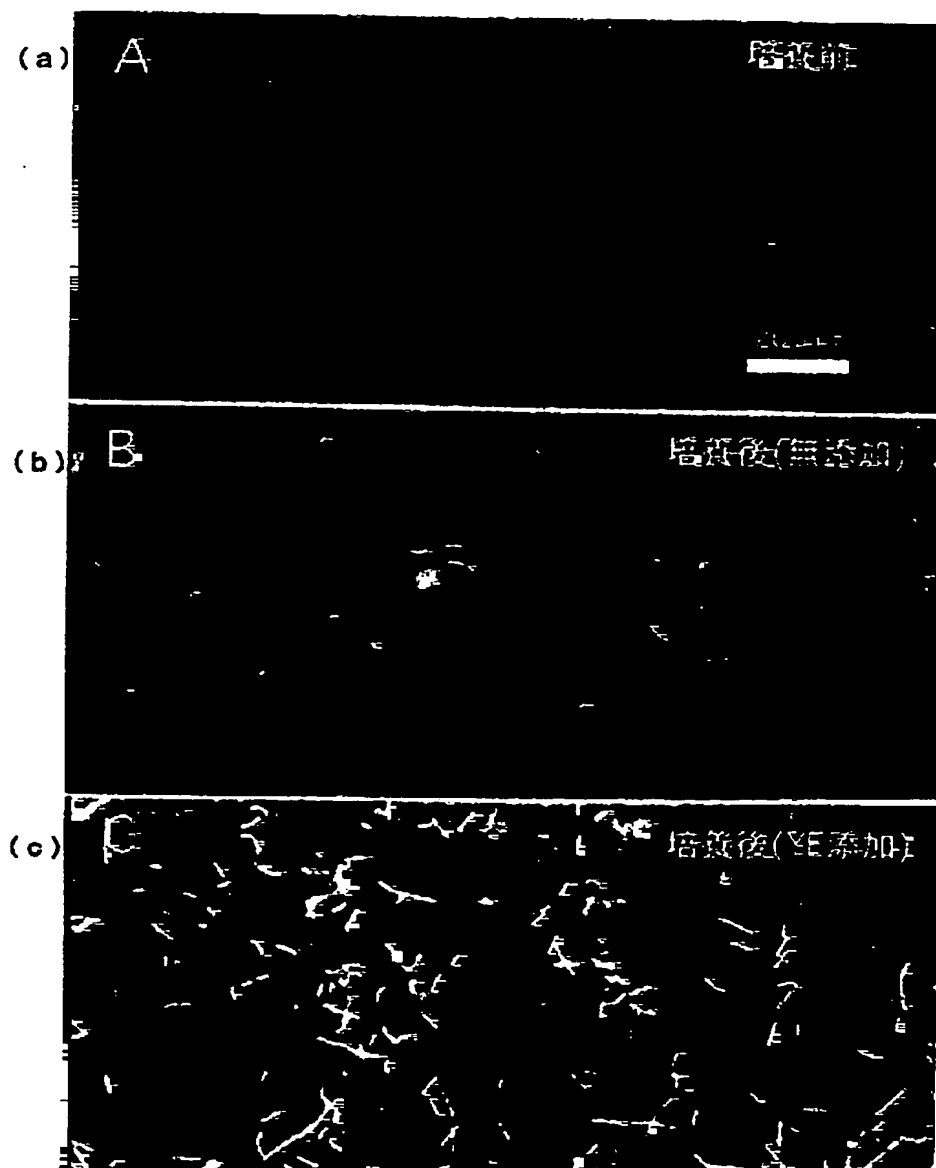
【図4】





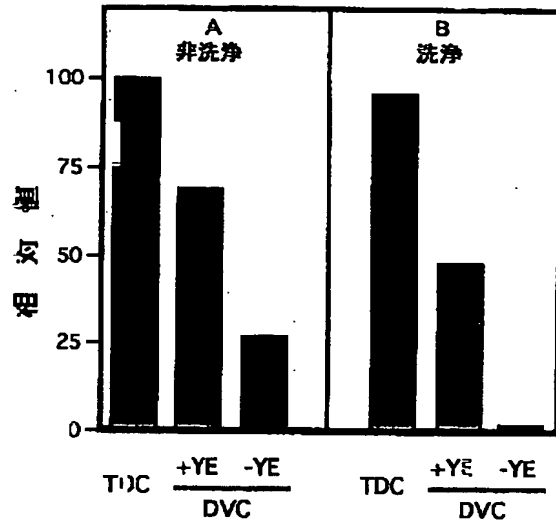
(8) 開2000-79000 (P2000-79000A)

【図5】



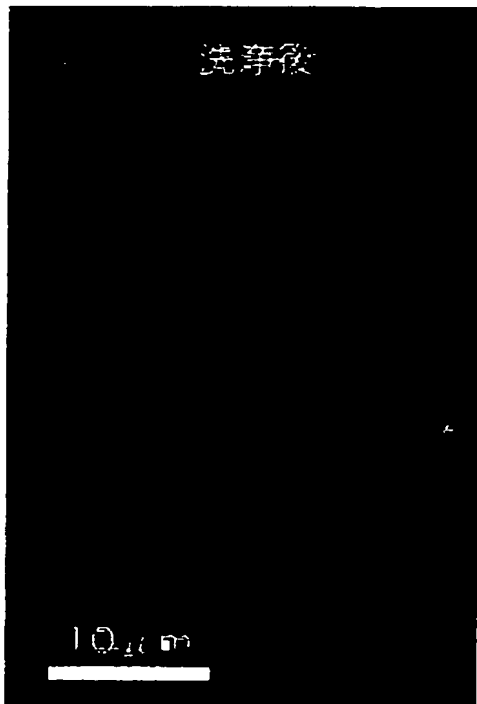
BEST AVAILABLE COPY

【図6】



【図7】

(b)

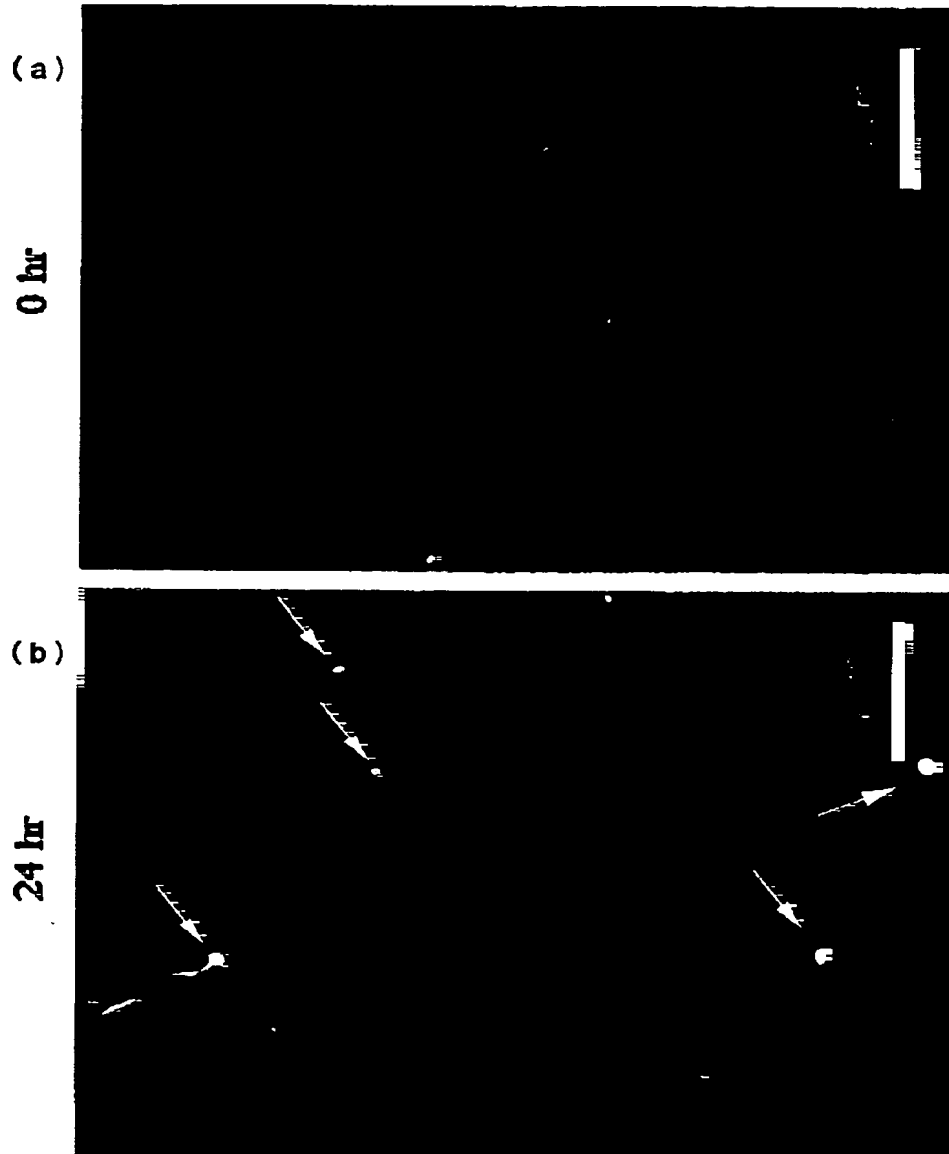


(a)



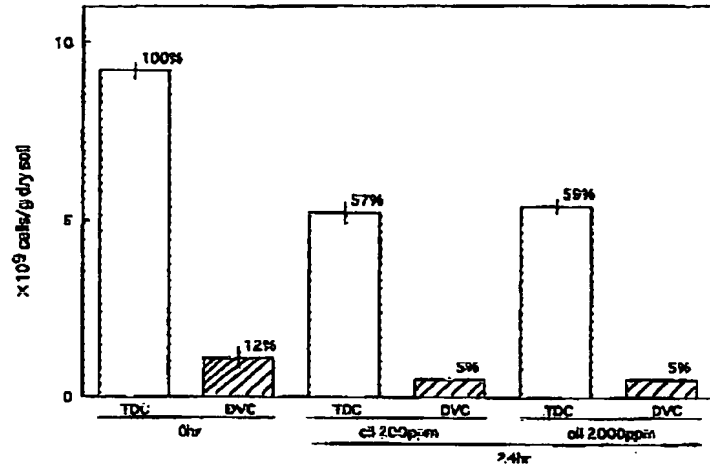
(10) 冊2000-79000 (P2000-79000A)

【図8】

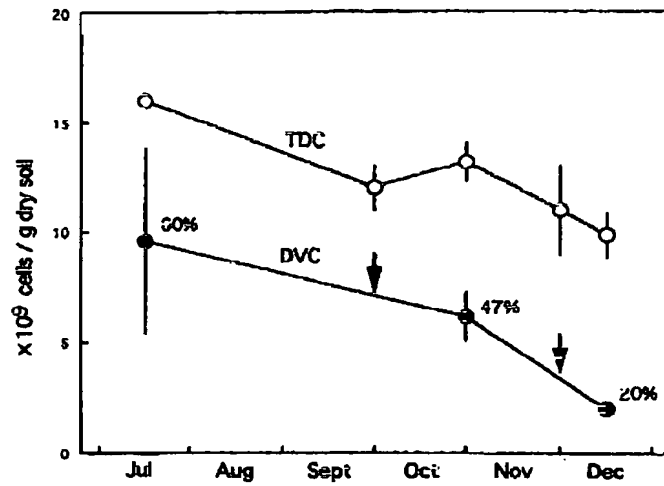


BEST AVAILABLE COPY

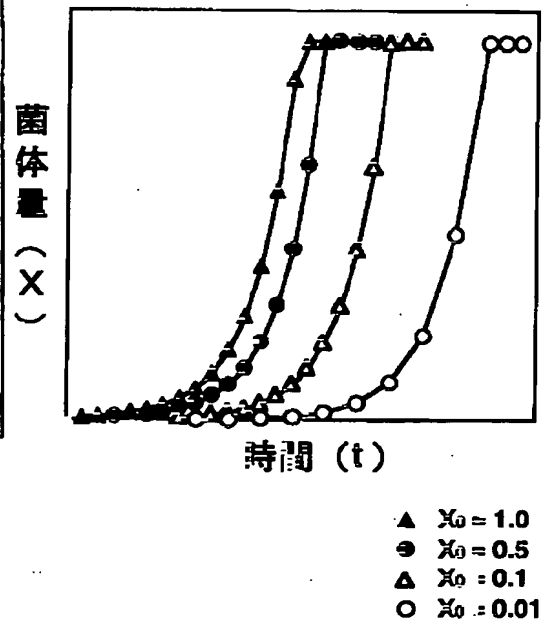
【図9】



【図10】



【図11】



【図12】

